

# N-아세틸글루코사민 생산을 위한 코리네박테리움 글루타미쿰의 대사공학

김진연<sup>1</sup>, 김부연<sup>2</sup>, 문경호<sup>1</sup>, 이진호<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>경성대학교 약학과

<sup>2</sup>경성대학교 식품응용공학부

Received: December 25, 2018 / Revised: December 29, 2018 / Accepted: January 4, 2019

## Metabolic Engineering of *Corynebacterium glutamicum* for N-acetylglucosamine Production

Jin-Yeon Kim<sup>1</sup>, Bu-yeon Kim<sup>2</sup>, Kyung-Ho Moon<sup>1</sup>, and Jin-Ho Lee<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacy, <sup>2</sup>Major in Food Biotechnology, School of Food Biotechnology & Nutrition, Kyungsoo University, Busan 48434, Republic of Korea

Recombinant *Corynebacterium glutamicum* producing N-acetylglucosamine (GlcNAc) was constructed by metabolic engineering. To construct a basal strain producing GlcNAc, the genes *nagA*, *nagB*, and *nanE* encoding N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase, glucosamine-6-phosphate deaminase, and N-acetylmannosamine-6-phosphate epimerase, respectively, were sequentially deleted from *C. glutamicum* ATCC 13032, yielding strain KG208. In addition, the genes *glmS* and *gna1* encoding glucosamine-6-phosphate synthase and glucosamine-6-phosphate N-acetyltransferase, which originated from *C. glutamicum* and *Saccharomyces cerevisiae*, respectively, were expressed in several expression vectors. Among several combinations of *glmS* and *gna1* expression, recombinant cells expressing *glmS* and *gna1* under control of the *ilvC* promoter produced 1.77 g/l of GlcNAc and 0.63 g/l of glucosamine in flask cultures.

**Keywords:** N-acetylglucosamine, glucosamine, *Corynebacterium glutamicum*, metabolic engineering

## 서론

글루코사민(glucosamine, GlcN)과 그 유도체인 N-아세틸글루코사민(N-acetylglucosamine, GlcNAc)은 세균, 진균류, 식물, 동물 등의 생명체에서 생합성되는 물질이다[1, 2]. GlcNAc는 진균류의 세포벽, 갑각류의 껍질, 곤충의 외골격 등에 분포하는 키틴(chitin)의 구성성분이며, 사람 관절에 분포하는 히알루론산(hyaluronic acid)과 세균 세포벽인 뮤레인(murein)의 주성분이다. GlcN과 GlcNAc의 용도로는 식품, 화장품, 의약품 등에 광범위하게 사용되고 있으며, 특히 관절 및 연골건강과 피부보습 가능성이 뛰어나 골관절염의 치료와 연골 및 관절건강을 유지하기 위한 목적으로 의약품 및 기능성 건강보조식품으로 많이 사용되고 있다[3–5].

GlcN과 GlcNAc는 화학적 방법, 효소처리법, 미생물 발효법 등으로 생산될 수 있다[3]. 현재 대부분의 GlcN은 계와 새우껍질에서 추출한 키틴을 진한 염산으로 가수분해하여 생산하고 있으며, 이를 10% 메탄올에 녹인 다음 무수초산(acetic anhydride)을 가하여 N-아세틸화 반응을 일으켜 GlcNAc이 생산되고 있다[3]. 그러나 이는 많은 폐수를 방출하는 비 친환경적인 공법이며, 제조과정에서 소량의 O-acetylated, di-acetylated 부산물들이 만들어지며, 용매와 트리부틸아민(tributylamine) 등이 아주 소량 제품에 잔존되는 문제점이 있다. GlcN과 GlcNAc은 endochitinases, exochitinases, chitobiosidases, N-acetylglucosaminidases로 이루어진 키틴분해효소에 의해 키틴의 가수분해에 의해 생산되는 연구결과가 많이 보고되어 있다[5, 6]. *Trichoderma viride*, *Aspergillus niger*, *Carcica papaya*, *Aeromonium* 등의 미생물에서 만들어지는 효소를 사용하여 키틴을 분해하여 GlcNAc를 만들 수 있다[7, 8]. 그러나, 효소의 활성과 안정성 유지, 낮은 전환율, 높은 효소제조비용 등의 문제점등

### \*Corresponding author

Tel: +82-51-663-4716, Fax: +82-51-622-4986

E-mail: jhlee83@ks.ac.kr

© 2019, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

을 해결해야 하며, 감각류 껍질에 대한 알레르기가 있는 사람의 경우에는 사용이 제한되는 문제점이 있다. 한편 재생가 능한 탄소원을 이용하여 미생물 발효를 통해 비 감각류 유 래의 GlcN과 GlcNAc를 생산하는 방법은 좋은 대안으로 여 겨진다. 곰팡이 *Aspergillus* sp. BCRC31742를 이용하여 배 양 중 2단계에 걸쳐 용존산소를 조절하는 방법을 통해 14.37 g/l의 GlcN을 얻었다[10, 11]. 곰팡이를 이용한 GlcN 의 생산은 화학적 방법과 비교하면 수율과 생산성이 낮은 문 제가 있다. 최근, Deng 등[12]과 Liu 등[13, 14]은 대사공학 을 통해 *Escherichia coli*와 *Bacillus subtilis*에서 매우 높은 농도의 GlcNAc를 생산하는 연구결과를 보고하였다. *E. coli* 에서 fructose-6-phosphate을 *N*-acetylglucosamine-6-phosphate (GlcNAc-6-P)로 단계적으로 전환하는 데 관여하는 효소들인 glucosamine-6-phosphate (GlcN-6-P) synthase와 glucosamine-6-phosphate *N*-acetyltransferase를 암호화하는 유전자 *glmS*와 *gna1*을 발현하고, GlcN-6-P에 의한 생산물 저해 (product inhibition)가 해제된 변이 glucosamine synthase 를 암호화하는 *glmS*를 과발현시키고, GlcNAc-6-P의 분해에 관여하는 *nagBACD*를 염색체에서 결손하고, 배출된 GlcN 과 GlcNAc를 세포 내로의 재 유입을 방지하기 위해 *manXYZ* 와 *nagE*를 결손한 균주를 개발하여 1-L 발효조에서 72시간 배양한 결과 110 g/l의 GlcNAc가 축적되는 것을 확인하였다 [12]. *B. subtilis*의 경우, *glmS*와 *gna1*을 과발현하고, GlcNAc-6-P의 분해에 관여하는 *nagA*, *nagB*, *gamA*를 결손하고, GlcNAc의 세포 내 재 유입에 관여하는 *nagP*를 결손하고, 젖 산과 아세트산의 축적을 방지하기 위해 *ldh*와 *pta*를 결손하 고, 해당과정과 펩티도글리칸 생합성에 관여하는 *pfk*와 *glmM* 유전자 발현을 억제하는 균주를 개발하여, 최종적으로 3-L 발효조에서 31.65 g/l의 GlcNAc을 생산하였다[13, 14]. 그러나, *E. coli*는 GRAS (generally regarded as safe) 미생물이 아니기 때문에 의약품 및 기능성 건강보조식품용으로는 많 은 제한이 따르며, *B. subtilis*를 이용한 방법은 생산물의 농 도가 낮아 추가적인 연구가 더 요구된다.

*Corynebacterium glutamicum*은 토양 유래 그람양성 미 생물로, 글루탐산과 라이신을 생산하는 대표적인 산업미생 물이다. 최근 합성생물학과 대사공학의 접목에 따라 dicarboxylic acid (succinic acid, glutaric acid, muconic acid), diamines (putriscine, cadaverine), alcohols (propanol, isobutanol), 아미노산( $\gamma$ -aminobutyric acid, 5-aminovaleate)과 같은 다양한 고부가가치 화합물 생산 연구가 매우 활발히 진 행되고 있다[15]. 건강기능식품과 의약품으로 가치가 있는 GlcN과 GlcNAc를 생산하기 위한 속주로 GRAS 미생물인 *C. glutamicum*을 사용하는 것은 매우 의미가 있다고 사료된다. 따라서, 본 연구에서는 *C. glutamicum* ATCC 13032에서 대 사공학을 통해 GlcNAc 생산에 필요한 *glmS*와 *gna1* 유전자

를 과발현하고 GlcNAc의 분해반응과 부반응으로 가는 대사 경로를 차단하여 포도당으로부터 GlcNAc를 생산하는 균주 를 개발하여 보고한다.

## 재료 및 방법

### 균주, 플라스미드 및 유전자 조작

연구에 사용한 균주와 플라스미드는 Table 1에 표시하였 다. 일반적인 유전자조작은 *E. coli* Top10 (Invitrogen, USA)을 사용하였으며, GlcNAc을 생산하기 위한 모균주는 *C. glutamicum* ATCC 13032를 사용하였다. 유전자 클로닝 과 발현을 위한 플라스미드는 pCX 시리즈 발현벡터(pCXT20, pCXS30, pCXS35, pCSI40, pCXI43, pCXI45)와 pCES208 을 사용하였다[16]. *C. glutamicum* 염색체에 존재하는 유전 자를 결손하기 위한 목적으로 pK19mobsacB 벡터를 사용하 였다[17]. 특정한 DNA 단편은 *Pfu*-X DNA polymerase (SolGent, Korea)를 사용하여 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 수행하여 얻었으며, 클로닝 후 염기 서열을 분석하여 DNA 염기서열을 확인하였다. *C. glutamicum* 의 형질전환용 세포(competent cell)의 제조와 전기천공법 (electroporation)은 이전 논문에 기술된 방법에 준하여 실시 하였다[18].

### DNA 조작용 제품 및 시약

DNA 제한효소는 New England Biolabs (USA)와 Enzynomics (Korea) 회사 제품을 사용하였다. DNA plasmid prep kit, Gel extraction kit, PCR premix kit, *Pfu*-X DNA polymerase kit는 Intron (Korea), GeneAll (Korea), Enzynomics (Korea), SolGent (Korea)에서 각각 구입하였 다. *N*-Acetylglucosamine, glucosamine 등의 고순도 시약은 Sigma-Aldrich (USA)에서 구입하였으며, 일반 시약은 Junsei (Japan)와 Duksan (Korea) 제품을 사용하였다. Tryptone과 yeast extract는 Difco (USA) 제품을 사용하였다.

### 배지조성과 배양조건

*E. coli*와 *C. glutamicum*은 LB (Luria Bertani; tryptone 10 g/l, yeast extract 5 g/l, NaCl 10 g/l) 배지를 사용하여 각각 37°C, 32°C에서 배양하였다. 필요시 항생제를 첨가할 경우, *E. coli*의 경우 100  $\mu$ g/ml ampicillin, 50  $\mu$ g/ml kanamycin, 25  $\mu$ g/ml chloramphenicol을 첨가하였으며, *C. glutamicum*의 경우 25  $\mu$ g/ml kanamycin, 4.5  $\mu$ g/ml chloramphenicol을 첨가하였다. GlcNAc과 GlcN 생산을 위 한 플라스미드 발효배지는 이전 논문에 기술된 첨가량에 준하 여 실시하였으며, 이때 아미노산은 첨가하지 않았다[19]. 30 ml의 발효배지를 함유한 250 ml 삼각플라스크에 LB 한

**Table 1. The bacterial strains and plasmids used in this study.**

Strain or plasmid	Characteristics <sup>c</sup>	Source or reference
<i>C. glutamicum</i>		
ATCC 13032	Wild-type strain	ATCC <sup>a</sup>
KG110	$\Delta$ nagAB	This work
KG208	$\Delta$ nagAB $\Delta$ nanE	This work
KG343	$\Delta$ nagAB $\Delta$ nanE with pCXI40- <i>glmS</i>	This work
KG430	$\Delta$ nagAB $\Delta$ nanE with pCXI40- <i>glmS</i> and pCES30- <i>gna1</i>	This work
KG440	$\Delta$ nagAB $\Delta$ nanE with pCXI40- <i>glmS</i> and pCES40- <i>gna1</i>	This work
KG443	$\Delta$ nagAB $\Delta$ nanE with pCXI40- <i>glmS</i> and pCES43- <i>gna1</i>	This work
KG445	$\Delta$ nagAB $\Delta$ nanE with pCXI40- <i>glmS</i> and pCES45- <i>gna1</i>	This work
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
Sake yeast		KCTC7904 <sup>b</sup>
T-Blunt	TA-blunt PCR cloning vector; Kan <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , 3.8 kb	Solgent Co.
T-Blunt- <i>glmS</i>	T-blunt derivative, 5.88 kb; 2.07 kb <i>glmS</i> ORF and self terminator	This work
T-Blunt- <i>gna1</i>	T-blunt derivative, 4.29 kb; 0.48 kb <i>gna1</i> ORF	This work
pXCM48	pXMJ19 derivative, 4.84 kb, Cm <sup>R</sup>	Lee [16]
pCXT20	pXCM48 derivative, 5.51 kb; P <sub>tac</sub>	Lee [16]
pXS530	pXCM48 derivative, 5.51 kb; P <sub>sod</sub>	Lee [16]
pCXT35	pXCM48 derivative, 5.51 kb; P <sub>sod-M1</sub>	Lee [16]
pCXI40	pXCM48 derivative, 5.51 kb; P <sub>ilvC</sub>	Lee [16]
pCXI43	pXCM48 derivative, 5.51 kb; P <sub>ilvC-M1</sub>	Lee [16]
pCXI45	pXCM48 derivative, 5.51 kb; P <sub>ilvC-M2</sub>	Lee [16]
pCX- <i>glmS</i> series	pXCM48 derivative, 7.14 kb; 2.07 kb <i>glmS</i> ORF and self terminator; 6 promoters (P <sub>tac</sub> , P <sub>sod</sub> , P <sub>sod-M</sub> , P <sub>ilvC</sub> , P <sub>ilvC-M1</sub> , P <sub>ilvC-M2</sub> )	This work
pCX- <i>gna1</i> series	pXCM48 derivative, 5.99 kb; 0.48 kb <i>gna1</i> ORF; 4 promoters (P <sub>sod</sub> , P <sub>ilvC</sub> , P <sub>ilvC-M1</sub> , P <sub>ilvC-M2</sub> )	This work
pCES208	<i>E. coli</i> / <i>C. glutamicum</i> shuttle vector; 5.93 kb, Kan <sup>R</sup>	This lab.
pCES208- <i>gna1</i> series	pCES208 derivatives, 7.03 kb; 0.48 kb <i>gna1</i> ORF; 4 promoters (P <sub>sod</sub> , P <sub>ilvC</sub> , P <sub>ilvC-M1</sub> , P <sub>ilvC-M2</sub> )	This work
pK19 <i>mobsacB</i>	Vector for allelic exchange in <i>C. glutamicum</i> (pK18 ori <sub>V.E.coli</sub> ; <i>sacB lacZa</i> ); 5.66 kb, Kan <sup>R</sup>	[17]
pK19- $\Delta$ nagAB	pK19 <i>mobsacB</i> derivative; 0.8 kb of an overlap PCR product of up/down region of <i>nagAB</i>	This work
pK19- $\Delta$ nanE	pK19 <i>mobsacB</i> derivative; 0.8 kb of an overlap PCR product of up/down region of <i>nanE</i>	This work

<sup>a</sup>ATCC, American Type Culture Collection.

<sup>b</sup>Korean Collection for Type Cultures.

<sup>c</sup>Amp<sup>R</sup>, ampicillin resistance; Kan<sup>R</sup>, kanamycin resistance; Cm<sup>R</sup>, chloramphenicol resistance.

천배지에서 1일간 배양된 균을 백금으로 직접 접종하고 진탕 배양기에서 32°C, 2일간 240 rpm으로 배양하였다. 모든 실험은 3회 반복 수행하여 그 평균치를 계산하여 표시하였다.

### 염색체내 유전자 결손 *C. glutamicum* 제작

*C. glutamicum* ATCC 13032를 주형 DNA로, P1-P2와 P3-P4 프라이머 세트(primer set)를 사용하여 PCR을 통해 *nagA* 유전자의 상류부위(upstream region)와 *nagB* 유전자의 하류부위(downstream region)의 0.4 kb DNA 단편들을 각각 얻은 다음, 다시 P1-P4를 사용하여 중첩(overlap) PCR하여 0.8 kb 단편을 얻어 정제한 후 *Hind*III와 *Eco*RI으로 처리하였다(Table 2). 이를 벡터 pK19*mobsacB*/*Hind*III/*Eco*RI에 클로닝하여, 최종적으로 플라스미드 pK19- $\Delta$ nagAB를 제작하였다(Table 1). 이를 전기천공법으로 *C. glutamicum* ATCC 13032에 도입하여 1차 상동성 재조합(homologous

recombination)을 통해 염색체에 삽입된 kanamycin 내성 형질전환주를 얻었다. 염색체내에서 *nagA* 상류부위 또는 *nagB* 하류부위로 삽입되었는지는 P5-P6, P7-P8로 PCR하여 확인하였으며, 삽입이 확인된 균주를 LB 액체배지에서 16시간 배양하여 희석한 다음 10% sucrose LB 한천배지에 도말하여 2차 상동성 재조합을 유도하고 kanamycin 내성이 없는 균을 선별하였다. *nagAB*가 결손 되었는지는 P5-P8 프라이머를 사용하여 PCR한 후 전기 영동으로 확인하여, 최종적으로 균주 KG110을 제작하였다. 한편, *C. glutamicum* ATCC 13032를 주형 DNA로, P9-P10, P11-P12를 프라이머 세트로 사용하여 PCR 하여 *nanE* 유전자의 상류부위와 하류부위 0.4 kb DNA 단편들을 얻고, P9-P12를 이용하여 다시 중첩 PCR하여 0.8 kb DNA 단편을 정제하였다(Table 2). 이를 *Hind*III와 *Eco*RI으로 효소처리 후 pK19*mobsacB*/*Hind*III/*Eco*RI에 클로닝하여, 최종적으로 플라스미드 pK19-

Table 2. Primer lists used in this study.

Primer	Sequence (5' → 3')	Remarks	
P1	ccccaagcttggcgcggggtgaggaatgc	<i>nagA</i> up region-F	<i>HindIII</i>
P2	cacttctgccatctttctgagg	<i>nagA</i> up region-R	
P3	cctcagaaagatggcagaagtgctgcgtagaaacaaaaggaaa	<i>nagB</i> down region-F	
P4	cccgaattcacttcgacgaggttttgggtg	<i>nagB</i> down region-R	<i>EcoRI</i>
P5	acgcgagcagtggtggttcaa	confirm primer	
P6	tttcttttttttctagcgcag	confirm primer	
P7	cctcagaaagatggcagaagtg	confirm primer	
P8	gggatcgcggtaatgggggtg	confirm primer	
P9	ccccaagcttgcctgacctgacatgcaggatta	<i>nanE</i> up region-F	<i>HindIII</i>
P10	ttaaaaggcgttatcggggca	<i>nanE</i> up region-R	
P11	tgcccgcgataacgccttttaa cacttagtccagcgtgcac	<i>nanE</i> down region-F	
P12	cccgaattcggatgaattggttttgatgcc	<i>nanE</i> down region-R	<i>EcoRI</i>
P13	tatgggcctacgggtgagca	confirm primer	
P14	gtgcagcctggactaagtg	confirm primer	
P16	tgcccgcgataacgccttttaa	confirm primer	
P16	atcgcaatggggtgaaggtgta	confirm primer	
P17	gaattcatgtggaattgttgatatattg	<i>glmS</i> cloning-F	<i>EcoRI</i>
P18	ggtaccacggcatggtcgtatgatcc	<i>glmS</i> cloning-R	<i>KpnI</i>
P19	gaattcatgagcttaccgatggatttta	<i>gna1</i> cloning-F	<i>EcoRI</i>
P20	aagcttctattttctaattgcattccacg	<i>gna1</i> cloning-F	<i>HindIII</i>

*AnanE*를 제작하였다(Table 1). *C. glutamicum* KG110 ( $\Delta$ *nagAB*) 균주에 제작된 플라스미드를 도입하고, 위에서 기술한 동일한 방법으로 1차, 2차 상동성 재조합을 유도하여 *nanE* 유전자가 결손된 KG208을 제작하였다. 1차 상동성 재조합을 통해 염색체내 *nanE* 상류부위 또는 하류부위로 삽입되었는지는 프라이머 P13-P14, P15-P16를 사용하여 PCR하여 확인하였으며, 2차 상동성 재조합을 통해 *nanE* 유전자가 결손된 것은 P13-P16 프라이머를 사용하여 PCR하여 확인하였다.

### 유전자 발현벡터 제작

유전자 *glmS*는 *C. glutamicum* 염색체를 주형 DNA로 사용하고 프라이머 P17-P18을 첨가하여 PCR을 수행하여 2.07 kb DNA 단편을 얻어 후, T-Blunt 벡터에 클로닝하여 플라스미드 T-Blunt-*glmS*를 제작하였다(Table 1, 2). *EcoRI* 과 *KpnI* 제한효소로 처리하여 다시 2.07 kb의 단편을 정제한 후, 이를 pCX 시리즈의 발현벡터인 pCXT20, pCXS30, pCXS35, pCXI40, pCXI43, pCXI45를 동일한 제한효소로 처리하고 정제한 플라스미드들과 DNA 접합(ligation)하여, 최종적으로 플라스미드 pCXT20-*glmS*, pCXS30-*glmS*, pCXS35-*glmS*, pCXI40-*glmS*, pCXI43-*glmS*, pCXI45-*glmS*를 각각 제작하였다(Table 1). *gna1* 유전자의 경우, *Saccharomyces cerevisiae* 염색체를 주형 DNA로 사용하고, 프라이머 P19-P20를 넣고 PCR을 수행하여 0.48 kb DNA 단편을 얻어 T-Blunt와 접합하여 플라스미드 T-Blunt-*gna1*을 제작하였다(Table 1, 2). 제한효소 *EcoRI*과 *HindIII*

로 처리 후 0.48 kb의 DNA 단편을 정제한 다음, *EcoRI*/*HindIII* 효소처리된 pCXS30, pCXI40, pCXI43, pCXI45와 DNA 접합하여, 최종적으로 플라스미드 pCXS30-*gna1*, pCXI40-*gna1*, pCXI43-*gna1*, pCXI45-*gna1*을 각각 제작하였다(Table 1). 이를 다시 복제원점이 다른 플라스미드 pCES208에 서브 클로닝(subcloning)하기 위하여, 각각 제한 효소 *NotI*과 *KpnI*으로 처리 후 1.2 kb를 회수하여 pCES208/*NotI*/*KpnI*과 접합하여, 최종적으로 pCES30-*gna1*, pCEI40-*gna1*, pCEI43-*gna1*, pCEI45-*gna1*을 제작하였다.

### 분석 방법

세포 생장은 분광광도계(UV-2550, Shimadzu, 일본)를 사용하여 600 nm에서 관찰하였으며, 포도당 농도는 ACCU-CHEK (서울, 한국)을 사용하여 측정하였다. GlcNAc와 GlcN의 농도는 HPLC (Shiseodo, Japan)로 분석하였다. 5 ml의 발효 배양액을 10,000 rpm에서 10분간 원심 분리하고 그 상등액을 acetonitrile로 적절히 희석한 후 0.45 mm 막여과기(membrane filter)로 여과하여 분석용 샘플을 준비하였다. 컬럼(column)은 Asahipak-NH<sub>2</sub>P50을, 검출기(detector)는 Shodex RI-104 (Shiseodo, Japan)를 사용하였으며, 이동상으로 80% acetonitrile을 사용하여 유속 0.5 ml/min, 온도 40°C 조건에서 분석하였다. 세포 배양액 15 ml을 원심 분리하여 회수 후 인산완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)로 2회 세척하고, 그 침전물에 PBS 1 ml을 넣고 현탁하였다. 1.5 ml 튜브에 0.1 mm 직경의 glass beads (BioSpec, USA) 0.5 g, PBS 0.5 ml을 넣은 후, 세포 현탁액 0.5-1 ml을 넣고



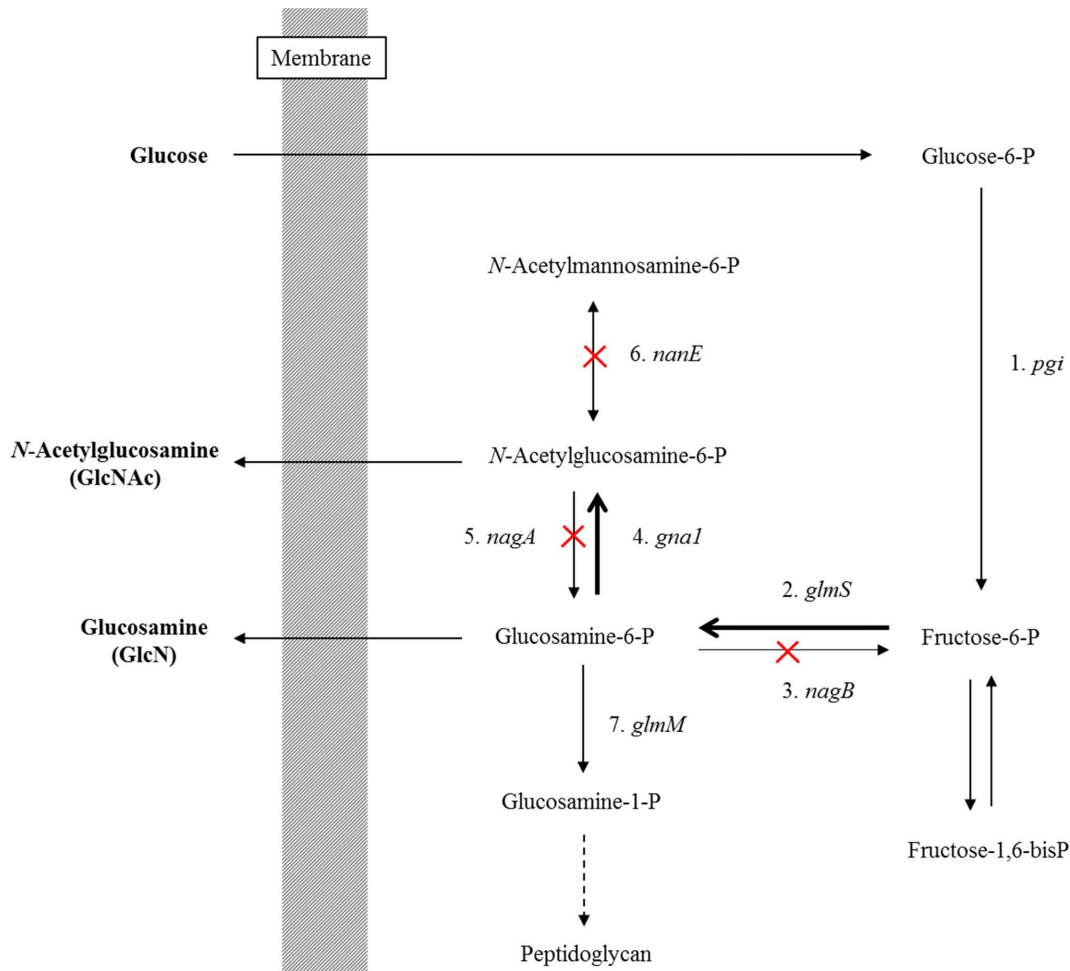
Bead beater (BioSpec, USA)로 세포를 파쇄하였다. 파쇄된 조효소 추출액을 13,000 rpm에서 10분간 원심 분리한 후 상등액을 취하여 단백질 분석에 사용하였다. 단백질 정량은 Thermo Scientific Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)를 사용하였다. SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)는 10% gel에 열처리한 단백질 10 µg을 넣고 전기영동하였다.

**결과 및 고찰**

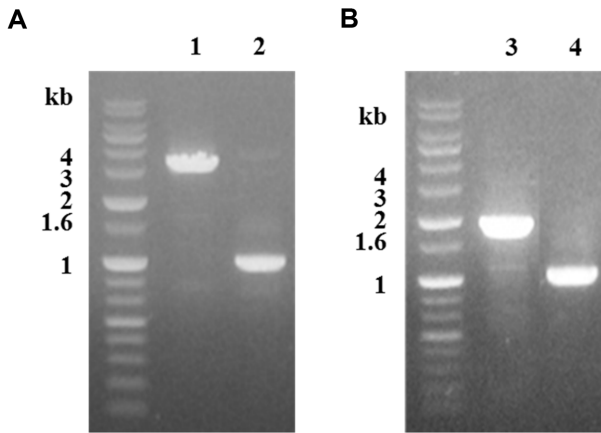
**염색체내 *nagAB*와 *nanE* 결손 *C. glutamicum* 개발**

GlcNAc은 해당과정의 대사물질인 fructose-6-phosphate에서 2단계 반응을 거쳐 생합성 될 수 있다. 포도당에서 GlcNAc

로 가는 탄소흐름이 강화된 기반균주를 개발하기 위해 대사물질들의 역반응과 결가지 경로를 차단할 필요가 있다(Fig. 1). *C. glutamicum*에는 *N*-acetylglucosamine-6-phosphate의 탈 아세틸화(deacetylation)를 촉매하는 *N*-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase (*NagA*, E.C. 3.5.1.25)와 glucosamine-6-phosphate의 탈 아미노화(deamination)를 촉매하는 효소인 glucosamine-6-phosphate deaminase (*NagB*, EC 3.5.99.6)가 존재하기 때문에, 염색체내 해당 유전자인 *nagA*와 *nagB*를 제거할 필요가 있다[20]. *nagA* 상류와 *nagB* 하류부분의 DNA 단편이 연결된 벡터 pK19- $\Delta$ *nagAB*를 제작한 후, 야생형 *C. glutamicum*에 도입하고 2회의 상동성 재조합을 유도하여 최종적으로 *nagAB* 유전자가 결손된 KB110 균주를 제작하였다(Table 1). PCR을 이용하여 분석한 결과, KB110 균



**Fig. 1. Metabolic engineering strategy for GlcNAc production in *C. glutamicum*.** Bold arrows indicate overexpression of corresponding genes; dashed arrows indicate multi-catalytic steps; crosses indicate the disruption of corresponding genes. Corresponding genes and enzymes are as follows. 1. *pgi*, phosphoglucose isomerase; 2. *glmS*, glucosamine-6-phosphate synthase; 3. *nagB*, glucosamine-6-phosphate deaminase; 4. *gnaI*, glucosamine-6-phosphate *N*-acetyltransferase; 5. *nagA*, *N*-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase; 6. *nanE*, *N*-acetylmannosamine-6-phosphate epimerase; 7. *glmM*, phosphoglucosamine mutase.

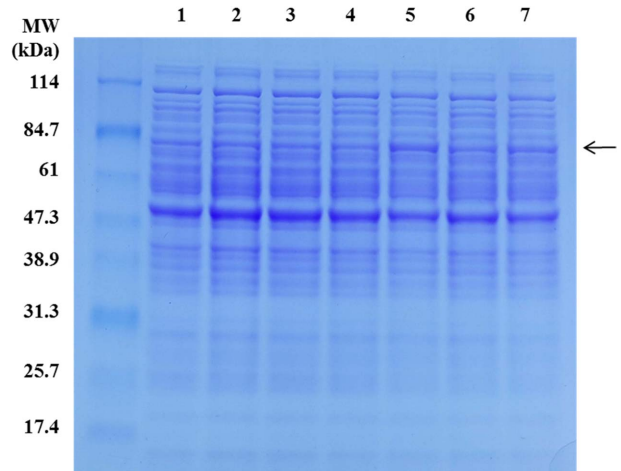


**Fig. 2. Confirmation of the deletion of *nagAB* in the strain KG110 (A) and *nanE* in the strain KG208 (B) by PCR analysis.** (A) Confirmation of the *nagAB* deletion in the strain KG110. Lane 1 and 2, respectively, showed the PCR fragments of ATCC13032 and KG110 using primers P5 and P8. (B) Confirmation of the *nanE* deletion in the strain KG208. Lane 3 and 4, respectively, showed the PCR fragments of KG110 and KG208 using primers P13 and P16. Colony PCR was carried out, and the deletion of about 1.95 kb of *nagAB* and 0.74 kb of *nanE* DNA fragments was confirmed in the strain KG110 and KG208, respectively (A and B).

주의 경우 야생형 균주와 비교하여 약 1.95 kb 크기의 DNA 단편이 감소하였으며, 이는 *nagAB* 유전자가 결손되었음을 보여준다(Fig. 2A). N-Acetylglucosamine-6-phosphate는 N-acetylmannosamine-6-phosphate epimerase (유전자 *nanE*) 효소촉매에 의해 N-acetylmannosamine-6-phosphate로 전환되는 결가지 경로가 *C. glutamicum*에 존재한다(Fig. 1) [21]. 이 경로를 차단하기 위하여 염색체상에서 *nanE* 유전자를 결손한 균주를 개발하였다. 먼저 *nanE* 유전자의 상류 및 하류 부분의 DNA 단편을 함유한 pK19-*AnanE*를 제작하고, 이를 KB110에 형질전환하여 *nanE* 유전자가 결손된 KG208 균주를 제작하였다(Table 1). Fig. 2B에서 보는 바와 같이 KG110 균주와 비교하여 KG208 균주는 *nanE* 유전자가 결손되어 DNA 단편이 약 0.74 kb 감소된 것을 PCR로 확인하였다.

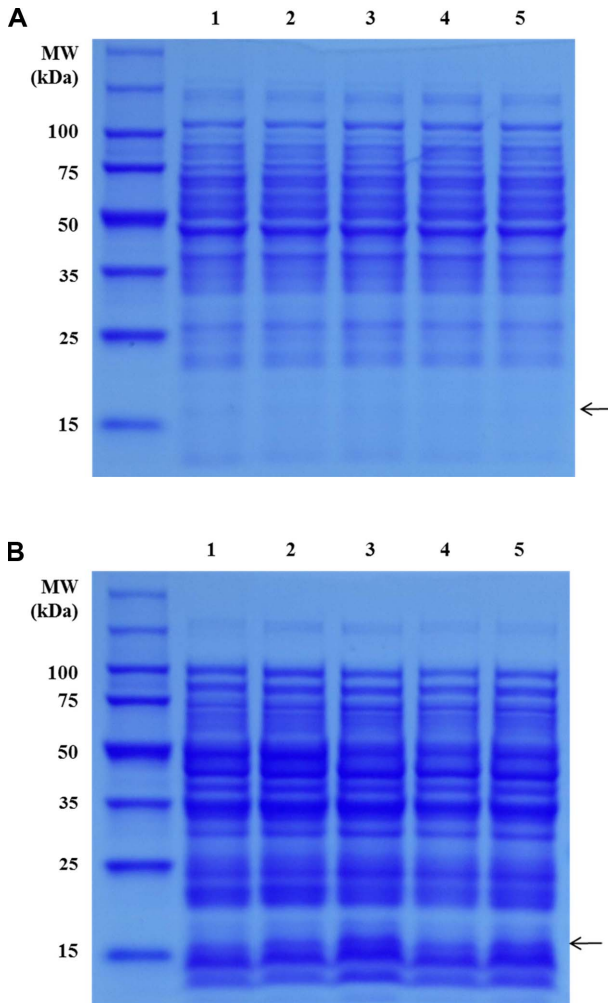
**C. glutamicum에서 *glmS* 및 *gna1* 유전자의 발현**

Glucosamine-6-phosphate synthase (GlmS, EC. 2.6.1.16)는 기질인 fructose-6-phosphate에 글루타민(glutamine)의 아미노기를 전달하여 glucosamine-6-phosphate를 생합성하는 반응을 촉매하는 효소로, GlcN과 GlcNAc의 생합성에 필수적인 효소이다(Fig. 1) [3, 12]. *C. glutamicum* 유래의 glucosamine-6-phosphate synthase를 암호화하는 *glmS* 유전자를 잘 발현하기 위하여 *C. glutamicum*에서 작동하는



**Fig. 3. SDS-PAGE of GlmS produced in *C. glutamicum* ATCC 13032.** Proteins were separated by 10% SDS-PAGE. Lanes 1, 2, 3, 4, 5, 6, and 7 represent crude extracts of cells harboring pCX48, pCXT20-*glmS*, pCXS30-*glmS*, pCXS35-*glmS*, pCXI40-*glmS*, pCXI43-*glmS*, and pCXI45-*glmS*, respectively. Arrow indicates the putative GlmS protein band.

6가지 종류의 발현벡터에 각각 클로닝하였다(Table 1). 제작된 벡터들을 각각 *C. glutamicum* ATCC 13032에 도입하고, 조효소액을 제조하여 SDS-PAGE를 통해 단백질의 생산을 비교 분석하였다(Fig. 3). 그 결과 이론적인 단백질 분자량인 67,214 Da보다 약간 높은 위치에서 pCXI40-*glmS*, pCXI45-*glmS* 플라스미드를 함유한 재조합 *C. glutamicum*에서 GlmS 단백질이 잘 생산된 것으로 추정되며, 특히 pCXI40-*glmS*를 함유한 균주에서 가장 높은 수준의 단백질이 생산되는 것으로 추정된다. 따라서, *ilvC* 프로모터(promoter)에 결합된 *glmS* 유전자를 함유한 플라스미드 pCXI40-*glmS*를 다음 연구에 사용하였다. Glucosamine-6-phosphate N-acetyltransferase (GNA1, EC 2.3.1.4)는 glucosamine-6-phosphate에 아세틸(acetyl)기를 전달하여 N-acetylglucosamine-6-phosphate를 생합성하는데 관여하는 효소로, *C. glutamicum*에는 존재하지 않기 때문에 이종의 미생물에서 도입하여야 한다[22]. 본 연구에서는 *S. cerevisiae* 유래의 *gna1* 유전자를 PCR로 증폭하여 4가지 종류의 발현벡터에 각각 클로닝하였다(Table 1) [22]. GNA1 효소가 잘 생산되는지를 확인하기 위하여, 제작된 벡터를 *C. glutamicum* ATCC13032에 도입하고, SDS-PAGE를 통해 GNA1 단백질의 합성 정도를 분석하였다(Fig. 4A). 이론적인 분자량인 18,134 Da 부위에서 대조균의 조효소액과 비교하여 특별한 차이를 확인할 수 없었다. 효소가 불용성의 봉입체(inclusion body) 형태로 생산되는지를 확인하기 위하여 원심분리하여 얻은 조효소액의 침전물을 SDS-PAGE로 분석한 결과에서도 발현의 차이를 확인할 수 없었다(결과는



**Fig. 4. SDS-PAGE of GNA1 produced in *C. glutamicum* ATCC 13032 (A) and in *E. coli* Top10 (B).** Proteins were separated by 10% SDS-PAGE. Lanes 1, 2, 3, 4, 5 represent crude extracts of cells harboring pCX48, pXS30-*gna1*, pCXI40-*gna1*, pCXI43-*gna1*, and pCXI45-*gna1*, respectively. Arrows indicates the putative GNA1 protein band.

제시하지 않음). GNA1 효소 생산이 미생물 숙주 차이에 기인되는지를 확인하기 위하여 제작된 플라스미드를 *E. coli*에

형질전환하여 제조된 조효소액을 이용하여 SDS-PAGE로 분석하였다(Fig. 4B). 그 결과, 플라스미드 pCXI40-*gna1*과 pCXI45-*gna1*을 함유한 *E. coli*에서 GNA1 효소 생산이 잘 되는 것을 확인하였다. 따라서, GNA1 효소는 숙주세포의 차이에 기인하여 *C. glutamicum*에서는 잘 생산이 안 되는 것으로 추정된다. SDS-PAGE 실험에서 가장 우수한 GNA1 생산을 나타내는 플라스미드를 선택할 수 없어, GlcN과 GlcNAc의 생산능력을 평가하는 실험에는 4가지 재조합 플라스미드를 모두 이용하였다.

#### 재조합 *C. glutamicum*에서 GlcN과 GlcNAc 생산

SDS-PAGE 분석결과에서 GlmS 효소합성이 가장 우수한 것으로 판단된 플라스미드 pCXI40-*glmS*를 기반균주인 KG208에 형질전환하여 재조합균주 KG343을 제작하였다. 한편, 유전자 *glmS*와 *gna1*은 모두 동일한 복제원점을 함유한 발현벡터에 클로닝되어 있기 때문에 두 플라스미드를 *C. glutamicum*에 동시에 도입할 수 없어 또 다른 *E. coli/C. glutamicum* 셔틀벡터(shuttle vector)인 pCES208 벡터에 *gna1* 유전자를 서브클로닝하여 4가지 종류의 pCES208-*gna1* 시리즈 벡터를 제작하였다(Table 1) [16]. KG343 균주에 이들 플라스미드를 각각 도입한 후 삼각플라스크에서 48시간 발효하여 GlcN과 GlcNAc의 생산농도를 측정하였다(Table 3). 플라스미드 pCXI40-*glmS*을 함유한 KG343의 경우, 기대와는 달리 GlcN이 생산되지 않았다. *glmS*가 발현되는 재조합 *E. coli*를 이용하여 배양한 결과, 일반적으로 glucosamine-6-phosphate synthase는 반응 생성물인 glucosamine-6-phosphate에 의해서 효소 활성이 강하게 저해(inhibition) 받는 것으로 알려져 있다[12]. 아마도, *C. glutamicum* 유래의 GlmS도 glucosamine-6-phosphate에 의해서 효소 활성이 강하게 저해를 받아 GlcN이 거의 생산되지 않는 것으로 판단된다. 한편, *glmS*가 발현되는 균주에 프로모터 *sod*에 의해 *gna1* 유전자가 동시에 발현되는 균주인 KG430에서는 GlcN과 GlcNAc이 전혀 생산되지 않았다. *gna1* 유전자가 각각 *ilvC*, *ilvC*-M1, *ilvC*-M2 프로모터에서 발현되는 균주인 KG440, KG443, KG445에서는 GlcNAc가 약 0.8–1.8 g/l 생산되었으며, KG440과 KG443은 GlcN도 함

**Table 3. Production of GlcN and GlcNAc by recombinant *C. glutamicum* in flask culture.**

Strain	Plasmids	OD <sub>600nm</sub>	GlcN (g/l)	GlcNAc (g/l)
KG343	-	71.8 ± 4.6	0	0
KG430	pCES30- <i>gna1</i>	72.8 ± 4.3	0	0
KG440	pCXI40- <i>glmS</i> pCEI40- <i>gna1</i>	64.5 ± 1.6	0.63 ± 0.04	1.77 ± 0.08
KG443	pCEI43- <i>gna1</i>	67.2 ± 1.6	1.05 ± 0.04	0.93 ± 0.01
KG445	pCEI45- <i>gna1</i>	75.2 ± 1.3	0	0.76 ± 0.02

Cells were harvested and analyzed after 48 h cultivation in flasks. Values represent means and standard deviations of triplicate cultivations.



게 생산되었다. 특히, KG440은 총 GlcNAc와 GlcN 생산량 측면에서 가장 우수한 결과를 나타내었다. 한편, GlcNAc-6-P와 GlcN-6-P의 탈 인산화와 세포 외 배출에 관한 기작은 알려져 있지 않지만, alkaline phosphatase와 sugar phosphatases의 촉매에 의해 탈 인산화되어 배출되는 것으로 추정된다. 지금까지 재조합 *E. coli*에서 110 g/l의 GlcNAc이 생산된 보고가 있으며, *Bacillus*의 경우, 31.65 g/l 생산되는 결과가 알려져 있다[12, 14]. 그러나, 세포외막 성분의 독성문제로 인해 *E. coli*를 생산 숙주로 사용하여 건강기능성 식품용도로 GlcNAc를 생산하는 것은 부적절한 것으로 사료된다. 또한, *Bacillus*는 아직 그 생산농도가 낮은 수준으로 추가적인 생산연구가 더 요구된다. 본 연구에서 개발된 *Corynebacterium*은 GlcNAc 생산농도는 매우 낮은 수준이지만, GRAS (generally regarded as safe) 미생물에서 GlcN과 GlcNAc를 처음으로 생산할 수 있음을 증명한 것에 그 의미를 부여할 수 있다. 한편, 생산농도가 매우 낮은 원인은 본 연구에 도입된 *C. glutamicum* 유래의 glucosamine-6-phosphate synthase가 그 생산물인 glucosamine-6-phosphate에 의해 효소활성이 강하게 저해를 받기 때문인 것으로 추정되므로, 향후 효소 개량을 통해 생산물 저해를 받지 않는 glucosamine-6-phosphate synthase를 개발하거나 이미 개발된 다른 미생물 유래의 이종의 *glmS*를 도입하면 이 문제를 해결할 수 있을 것으로 판단된다[23]. 또한, 본 연구에서 개발된 균주를 사용하여 향후 GlcNAc의 유입 차단, 배출 강화와 같은 추가적인 대사공학과 배지 및 배양공정 최적화를 통해 고농도의 GlcNAc를 생산하는 기술을 개발할 수 있을 것으로 기대된다.

## 요 약

대사공학을 이용하여 *N*-아세틸글루코사민(GlcNAc)을 생산하는 재조합 *Corynebacterium glutamicum*을 개발하였다. 먼저 GlcNAc를 생산하는 기반균주를 제작하기 위하여, *N*-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase와 glucosamine-6-phosphate deaminase를 암호화하는 *nagAB*와 *N*-acetylmannosamine-6-phosphate epimerase를 암호화하는 *nanE*를 *C. glutamicum* ATCC 13032에서 순차적으로 결손하여, 최종적으로 KG208 균주를 제작하였다. 또한, glucosamine-6-phosphate synthase를 암호화하는 *C. glutamicum* 유래의 *glmS*와 glucosamine-6-phosphate *N*-acetyltransferase를 암호화하는 *Saccharomyces cerevisiae* 유래의 *gna1*을 각각 여러 발현벡터에 클로닝하였다. 여러 발현 조합의 플라스미드들 중에서 pCXI40-*glmS*와 pCEI40-*gna1*을 함유한 재조합균주 KG440은 삼각플라스크 발효에서 1.77 g/l의 GlcNAc와 0.63 g/l의 글루코사민을 생산하였다.

## Acknowledgments

This work was funded by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF-2018R1D1A1B07047207) and the BB21+ Project in 2018.

## Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

## References

- Hsieh JW, Wu HS, Wei YH, Wang SS. 2007. Determination and kinetics of producing glucosamine using fungi. *Biotechnol. Prog.* **23**: 1009-1016.
- Sitanggang AB, Sophia L, Wu HS. 2012. Aspects of glucosamine production using microorganisms. *Int. Food Res. J.* **19**: 393-404.
- Liu L, Liu Y, Shin HD, Chen RR, Li J, Du G, et al. 2013. Microbial production of glucosamine and N-acetylglucosamine: advances and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**: 6149-6158.
- Nakamura M, Hikida M, Nakano T, Ito S, Hamano T, Kinoshita S. 1993. Characterization of water retentive properties of hyaluronan. *Cornea* **12**: 433-436.
- Park C, Chung KH, Jeong TR, Yang HP, Nam KS, Kim CH. 2000. Effects of N-acetylglucosamine on suppression of collagenolysis and bone resorption in mouse calvarial osteoblasts. *J. Chitin Chitosan* **5**: 79-87.
- Cohen-Kupiec R, Chet I. 1998. The Molecular biology of chitin digestion. *Curr. Opin. Biotechnol.* **9**: 270-277.
- Suresh PV. 2012. Biodegradation of shrimp processing bio-waste and concomitant production of chitinase enzyme and N-acetyl-D-glucosamine by marine bacteria: production and process optimization. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 2945-2962.
- Donzelli BGG, Ostroff G, Harman GE. 2003. Enhanced enzymatic hydrolysis of langostino shell chitin with mixtures of enzymes from bacterial and fungal sources. *Carbohydr. Res.* **338**: 1823-1833.
- Nampoothiri KM, Sandhya TVBC, Sabu A, Szakacs G, Pandey A. 2004. Process optimization for antifungal chitinase production by *Trichoderma harzianum*. *Process Biochem.* **39**: 1583-1590.
- Sitanggang AB, Wu HS, Wang SS, Ho YC. 2010. Effect of pellet size and stimulating factor on the glucosamine production using *Aspergillus* sp. BCRC 31742. *Bioresour. Technol.* **101**: 3595-3601.
- Zhang JX, Liu L, Li JH, Du GC, Chen J. 2012. Enhanced glucosamine production by *Aspergillus* sp. BCRC 31742 based on the time variant kinetics analysis of dissolved oxygen level. *Biore-sour. Technol.* **111**: 507-511.
- Deng MD, Severson DK, Grund AD, Wassink SL, Burlingame RP, Berry A, et al. 2005. Metabolic engineering of *Escherichia coli*



- for industrial production of glucosamine and N-acetylglucosamine. *Metab. Eng.* **7**: 201-214.
13. Liu Y, Liu L, Shin HD, Chen RR, Li J, Du G, *et al.* 2013. Pathway engineering of *Bacillus subtilis* for microbial production of N-acetylglucosamine. *Metab. Eng.* **19**: 107-115.
  14. Liu Y, Zhu Y, Li J, Shin HD, Chen RR, Du G, *et al.* 2014. Modular pathway engineering of *Bacillus subtilis* for improved N-acetylglucosamine production. *Metab. Eng.* **23**: 42-52.
  15. Becker J, Wittmann C. 2012. Bio-based production of chemicals, materials and fuels - *Corynebacterium glutamicum* as versatile cell factory. *Curr. Opin. Biotechnol.* **23**: 631-640.
  16. Lee J. 2014. Development and characterization of expression vectors for *Corynebacterium glutamicum*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 70-79.
  17. Schäfer A, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G, Pühler A. 1994. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**: 69-73.
  18. van der Rest ME, Lange C, Molenaar D. 1999. A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogeneic plasmid DNA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**: 541-545.
  19. Syukur PH, Kang MS, Ferrer L, Han SS, Lee JY, Kim HS, *et al.* 2018. Rational engineering of the shikimate and related pathways in *Corynebacterium glutamicum* for 4-hydroxybenzoate production. *J. Biotechnol.* **282**: 92-100.
  20. Matano C, Uhde A, Youn JW, Maeda T, Clermont L, Marin K, *et al.* 2014. Engineering of *Corynebacterium glutamicum* for growth and L-lysine and lycopene production from N-acetylglucosamine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**: 5633-5643.
  21. Uhde A, Brühl N, Goldbeck O, Matano C, Gurow O, Rückert C, *et al.* 2016. Transcription of sialic acid catabolism genes in *Corynebacterium glutamicum* is subject to catabolite repression and control by the transcriptional repressor NanR. *J. Bacteriol.* **198**: 2204-2218.
  22. Mio T, Yamada-Okabe T, Arisawa M, Yamada-Okabe H. 1999. *Saccharomyces cerevisiae* GNA1, an essential gene encoding a novel acetyltransferase involved in UDP-N-acetylglucosamine synthesis. *J. Biol. Chem.* **274**: 424-429.
  23. Deng MD, Grund AD, Wassink SL, Peng SS, Nielsen KL, Huckins BD, *et al.* 2006. Directed evolution and characterization of *Escherichia coli* glucosamine synthase. *Biochimie* **88**: 419-429.